

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03344

研究課題名(和文) 神経系におけるトランスクリプトーム品質管理機能と関連疾患の解明

研究課題名(英文) Elucidation of novel quality control of RNA processing and its related diseases in the nervous system

研究代表者

飯島 崇利 (Iijima, Takatoshi)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：90383702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：RNAスプライシングは生命情報の多様化に最も重要な仕組みであり、高等動物では膨大な数のRNAバリエーションが生み出される。複雑となった高等動物のRNAスプライシング過程では様々なエラーが起こりうるのに対し、膨大なトランスクリプトーム品質がどのようにエラーから保護されているのか、その仕組みについては理解されていない。重要なことに、最近我々は神経系においてスプライシングエラーを防止する興味深い仕組みを解明した。RNA結合タンパク質SAM68はその主なマシナリーの一つであり、この仕組みの破綻は発達障害や精神疾患の異常を反映し、主にシナプスの形成維持や機能に影響を与えていることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進化の過程で飛躍的に高度化したスプライシング制御は一体どのように適切に管理維持されているのであろうか？なぜなら、スプライシング活動の高度化は同時にその過程の複雑化を招き、特に高等動物では非常に長くなったイントロンがなぜどのようにエラーを起こさず正確にプロセスされるのか、膨大なトランスクリプトームの品質管理のメカニズムについては未解明な部分が多かった。本課題における成果は、脳機能を守る分子基盤としてのトランスクリプトーム品質管理のメカニズムと生理学的重要性の一旦を解明し、生物の遺伝情報多様化の謎の仕組みの理解に貢献できたと信じる。

研究成果の概要(英文)：RNA splicing is the powerful mechanism for the diversification of biological information and produces a huge number of RNA variants in mammal. While the higher complexity of RNA splicing during evolution could cause a lot of processing errors, the mechanism underlying quality control during the splicing process is not understood. Importantly, we have recently uncovered an interesting mechanism that prevents prematuration of pre-mRNAs in the nervous system: the RNA-binding protein SAM68 is one of its major machineries, and we have shown that dysregulation of this mechanism can reflect abnormalities in developmental and psychiatric disorders, primarily affecting the maintenance of synapse formation and function.

研究分野：神経科学

キーワード：スプライシング RNA シナプス RNA結合タンパク質

1. 研究開始当初の背景

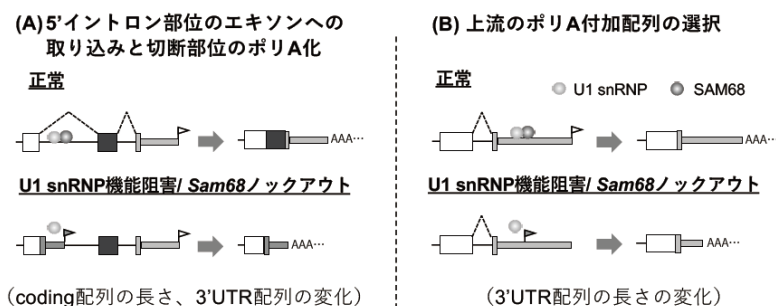
高等動物の脳は約 1000 億個にも及ぶ多様な神経細胞が特異的回路を築き、それらの複雑な同期によって高次活動が営まれる最も複雑な臓器である。RNA スプライシングは生命情報の多様化に最も重要な仕組みであり、神経系においては特に盛んに行われ、膨大な RNA バリエーションが生み出される。この過程は僅か 2-3 万遺伝子程度のゲノム情報から、複雑な脳機能の創出に必要な生命情報獲得を補償する重要なステップである。

これまで我々は神経系において、選択的スプライシング機構による生命情報多様性の獲得が、神経細胞の個性決定、細胞間認識や特異的ネットワーク形成に必要な生命の高次機能を構成することを明らかにしつつ、選択的スプライシングが脳の発生時期や各領域において、また神経活動レベル等でどのように調節されているかを研究してきた結果、時空間的制御のキーとなる神経系スプライシング調節因子 SAM68 とそのファミリー分子である SAM-like molecule 1/2 (SLM1, SLM2) を同定した (Iijima et al., *Cell.*, 2011 & *J. Cell Biol.*, 2014)。これらは中枢神経系で重要なシナプス形成因子である Neurexin のスプライシング調節を行い、Neurexin の複数の結合パートナーとの相互作用を可能にし、神経回路形成と可塑性を支配することが証明され、Neurexin のスプライシング調節によるシナプス制御は、時空間的スプライシングの重要性を主張する代表的な研究となったが (Aoto et al., *Cell.*, 2013; Fullisco et al., *Neuron.*, 2014; Traunmüller et al., *Science.*, 2016)、我々はさらに SAM68/SLM の標的 RNA 基質の同定など通じ、時空間的スプライシングプログラムの全貌解明を試みてきたが、意外にも、*Sam68* 欠損では異常なイントロン部の挿入やポリ A 化、すなわち **Alternative Last Exon (ALE) のスプライシング異常** が起っていたことから、SAM68 がカセットエクソン選択などの典型的なスプライシング過程に関わる他に、適切な ALE 選択を制御することによって RNA 前駆体をスプライシングエラーから保護するさらに重要な機能があることを発見した (Iijima, Y., Tanaka, M., and Suzuki, S., et al., *iScience.*, 2019)。本研究課題の開始当初としては、新規性および独創性の高い内容と、publication 以外の多くの予備データをすでに揃えていたことで、高等動物の脳機能に必須な生命情報多様性が適切に管理維持される仕組みの生物学的意義の理解と、その破綻による脳・神経疾患の解明に十分貢献できると信じ、本研究課題の提案に至った。

2. 研究の目的

脳は非常に多種類の細胞群のネットワークによって機能する最も複雑な組織であり、高等動物において 1000 億個もの神経細胞による複雑な神経回路形成や情報伝達様式は多種多様である。脳はスプライシング活動が最も盛んな臓器である (Xu et al., 2002)。僅か 2-3 万遺伝子程度のゲノム情報から脳の高次活動に必要な膨大な生命情報を引き出すため、スプライシングレベルでの生命情報多様化機構は進化的に大きな発展を遂げ、その役割を果たしてきたと考えられる。一方で、「進化の過程で飛躍的に高度化したスプライシング制御は一体どのように適切に管理維持されているのであろうか？」なぜなら、スプライシング活動の高度化は同時にその過程の複雑化を招き、特に高等動物では非常に長くなったイントロンがなぜどのようにエラーを起こさず正確にプロセスされるのか、膨大なトランスクリプトームの品質管理のメカニズムについては未解明な部分が多い。その中でスプライソソーム U1 snRNP は、誤った部位でのイントロン切断とポリ A 化を防ぐことで RNA 前駆体のスプライシングエラーを未然防止し、mRNA を適切に生み出すために重要な役割を果たすことが知られてきた (Kaida et al., *Nature.* 2010) (図 1)。細胞株においてアンセンスオリゴによる U1 snRNP 機能阻害下では多くの mRNA 3'末端側の短縮化が起こる。しかし、各臓器・組織レベルにおけるトランスクリプトーム品質管理の仕組みや生理学的重要性については長い間謎であった。

興味深いことに、最近申請者らは神経系 RNA 結合タンパク質 SAM68 が、U1 snRNP と同様に RNA 前駆体のスプライシングエラーを未然防止することを発見した。*Sam68* 欠損によるシナプス接着因子 IL-1 receptor-associated protein (*Il1rap*) の ALE タイプのスプライシングエラーは mRNA を短縮化させ、IL1RAP 依存的なシナプス形成と可塑性の異常を引き起こした (Iijima et al., *iScience* 2019)。同時に最近、生殖細胞で SAM68 と U1 snRNP と



(図 1) U1 snRNP機能阻害およびSam68ノックアウト脳で起こるスプライシングエラーとmRNA3'末端側の短縮化

の相互作用が報告され (Naro et al., *Cell Rep.*, 2019)、神経系においても SAM68 は U1 snRNP との協調作用によってエラーを防止することが示唆された。

本研究課題では、SAM68 および U1snRNP との協調作用に支配される神経系のトランスクリプトーム品質管理の全貌を解読し、mRNA の短縮化を指標としてその機能破綻が引き起こす生理学的障害について分子、細胞レベルで解析する。したがって、本研究課題は、分子から細胞、個体行動レベルまでの縦断的な解析により、脳機能を守る分子基盤としてのトランスクリプトーム品質管理のメカニズムと生理学的重要性を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

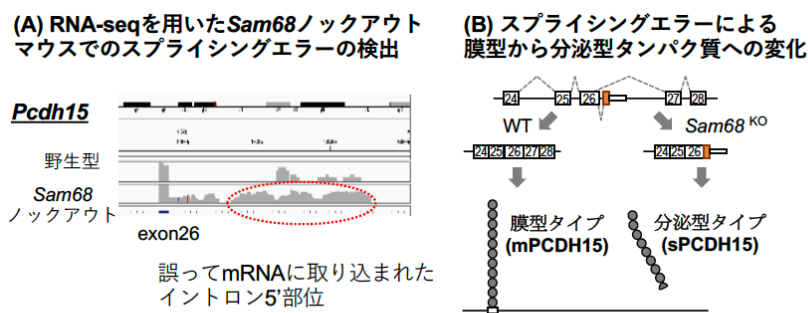
(計画 1) 神経系における Sam68/U1 snRNP によるトランスクリプトーム品質管理機構のメカニズム解明

これまで申請者は、エキソンアレイと RNA-seq により Sam68 ノックアウト脳で多くの mRNA が 3'末端部で短縮されていることを確認してきたが (Iijima et al., *iScience.*, 2019)。前述のように、最近、SAM68 は U1 snRNP との相互作用することが報告され (Naro et al., *Cell Rep.*, 2019)、神経系でも SAM68 が U1 snRNP との協調作用によってエラーを防止することが強く示唆された。そこで本課題では、U1 snRNP の機能阻害による影響についても解析し、神経細胞に及ぼす生理学的影響を調べるとともに、Sam68 ノックアウトにおける既存のプロファイルと比較し、その相関性から U1 snRNP との協調作用による SAM68 の ALE スプライシングのエラー防止メカニズムの解明を試みた。

HeLa 細胞においては、U1 snRNA が標的 pre-mRNA を認識結合する 5 末端に対するアンチセンスモルフォリノオリゴ (AMO) を適切量に投与して活性低下させると、エキソンのつなぎ合わせ自体にはほとんど影響せず、図 1A のように一部のイントロンが誤って mRNA に取り込まれスプライシングエラーによる途中切断と、3'末端の短縮化が引き起こされる (Kaida et al., *Nature.* 2010; Berg et al., *Cell.*, 2012)。本研究では U1 snRNP の機能の発見者である甲斐田博士 (現富山大学, 研究分担者) の協力を得て、この実験系を培養大脳皮質神経細胞にて行った。

(計画 2) SAM68 によるスプライシングエラー防止の生理学的意義の解明および精神疾患・発達障害との関連性の検討

IL1RAP の他にも、Sam68 ノックアウトの神経系でタンパク質レベルの変化を伴う ALE タイプのプライシングエラーの中に興味深いものとして Protocadherin-15 (Pcdh15) を挙げる。Sam68 欠損マウス脳ではイントロン 27 の 5 末端部位が誤って挿入され RNA プロセシングの途中終結が起こり、本来膜型として発現するタンパク質が atypical な分泌型に変換されてしまうことを突き止めている (図 2)。Pcdh15 は難聴に網膜変性を伴う Usher 症候群の原因遺伝子として知られる。神経機能に関しては未解明な部分が多いが、複数の SNP, CNV 多型、スプライシングバリエーションは機能喪失変異を伴い、うつ病、自閉症、統合失調症など複数の脳疾患と密接に関わることが示唆されてきた。そこで、本研究では Pcdh15 の ALE スプライシングエラーが引き起こす異常の解明を目的として、Crisper/Cas9 システムによる Pcdh15 遺伝子の微小欠損および分泌型 Pcdh15 を発現させた培養前脳神経細胞において生化学的、細胞生物学的に異常所見をスクリーニングし、さらに神経細胞に与える影響について主に本学生命科学統合支援センターなどの協力で生理学的にも解析を行った。



(図 2) Sam68 ノックアウトマウス脳におけるスプライシングエラーで起こる接着因子プロトカドヘリン15の変化

4. 研究成果

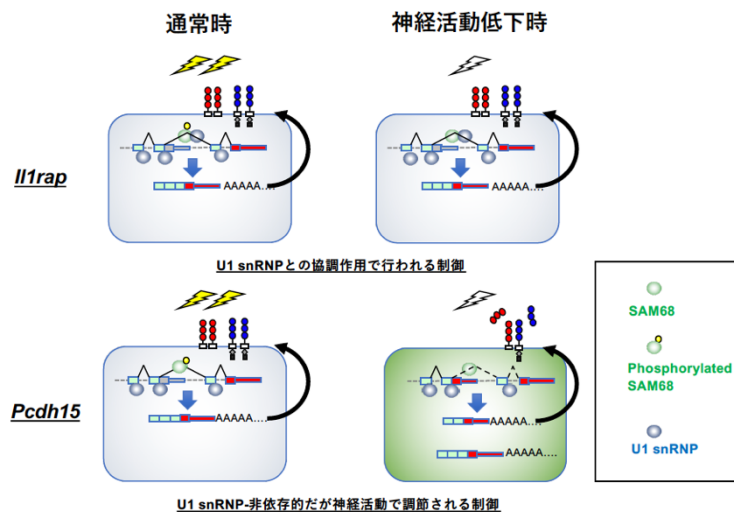
(1) 神経系における SAM68/U1 snRNP による ALE スプライシングエラー防止のメカニズムの解明

SAM68 の標的 pre-RNA 群の ALE を指標に、U1 snRNP のコンセンサス配列 (U1-like motif) を cryptic ポリ A 付加配列 (PAS) 近傍に有する transcript を網羅的に検索したところ、一部はこれを近傍に有していたことを確認した。我々がこれまで解析し発表した *Il1rap* や *Ceruloplasmin* など (Iijima et al., 2019) は U1-like motif を近傍に有していた。これに対し、U1-like motif を全く近傍に持たない標的 pre-mRNA も多く存在しており、本研究課題で注目した *Pcdh15* はその代表的な transcript であった。そこで以降の実験では、この二つの transcript を比較しながら、ALE スプライシングエラー防止の仕組みについて詳しく調べていった。

ここで我々は、神経細胞において甲斐田らが以前に用いた U1 AMO を培養神経細胞に導入し

て U1snRNP に対する依存性を調べた結果、*Il1rap* に関しては AMO の導入により ALE のスプライシング変化による 3' 末端側のスプライシングエラーが起き、3' 末端側が短縮されたが、*Pcdh15* では ALE エラーは観察されず、問題なく正常に全長の transcript が生成されていた。このことから、SAM68 は SAM68 による *Il1rap* の ALE スプライシング制御に関しては U1 snRNP との相互作用を介するが、一方精神神経疾患などの原因遺伝子である *Pcdh15* の ALE スプライシングに関しては U1 snRNP に依存していないことが示された。

Sam68 によるスプライシングはさまざまな外的刺激やその下流の Erk/MAPK, Src, CaMK などの細胞内シグナルによって制御を受けることがこれまでのさまざまな過去の報告で示されているが (Di Frascio et al., *PNAS*, 1999; Iijima et al., *Cell*, 2011 など)、本課題研究では神経細胞において *Pcdh15* は *Il1rap* に比べ神経活動などの外的刺激に影響されやすいこと、その下流経路の一つとして CaMK シグナルによる調節が見出された。我々は培養神経細胞において、TTX による神経活動の遮断および CaMK 阻害剤の投与によって、*Pcdh15* の ALE スプライシングが変化し、3' 末端側の短いアイソフォームが生み出されることを明らかにした。このように、神経系における SAM68 の ALE のスプライシングエラー防止は一様ではなく、U1snRNP 依存的なものと、一方では非依存性だが神経活動などによっても調節される少なくとも 2 つのメカニズムが存在していることが今回見出された (図 3)。

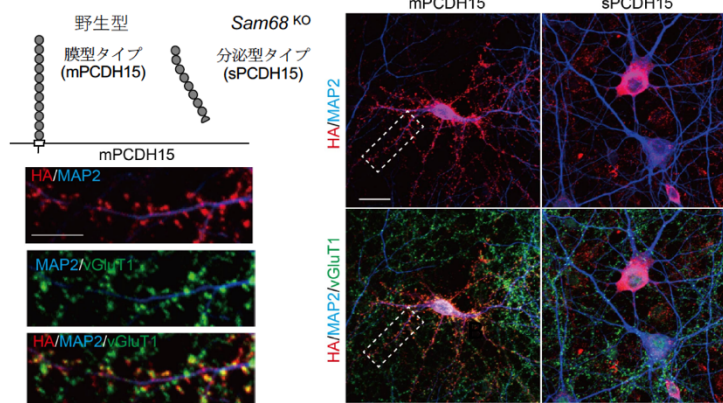


(図 3) 神経系における SAM68 依存的な二つの ALE スプライシング制御 (Darwish et al., *BioRxiv.*, 2023)

(2) SAM68 依存的な *Pcdh15* の ALE スプライシングエラー防止の破綻により起こるタンパク質局在の変化と神経機能障害

PCDH15 の大脳皮質神経細胞における細胞内局在を調べたところ、興奮性のシナプス後膜へ豊富に局在するから、興奮性シナプスの膜タンパク質として機能することが示唆された (図 4)。ALE の異常によって、タンパク質レベルで PCDH15 の C 末端部の膜貫通ドメインが欠如した膜型から可溶性に変換されると、この可溶性 PCDH15 (sPCDH15) では興奮性シナプスへの局在が劇的に阻害された。実際に機能喪失型変異である *Pcdh15* の exon6 を微小欠損 (*Pcdh15 ex6 KO*) させた大脳皮質神経細胞では、興奮性シナプス数の有意な減少が認められた。また、sPCDH15 を発現させた時にも同様の異常が見られた。これらの結果から、全長の膜型 PCDH15 がシナプスの形成や維持に関わる分子であるということが示唆された。sPCDH15 の機能喪失効果に関しては、シナプス上の膜型 *Pcdh15* の機能に競合してドミナントネガティブ的に作用する可能性が示唆された。

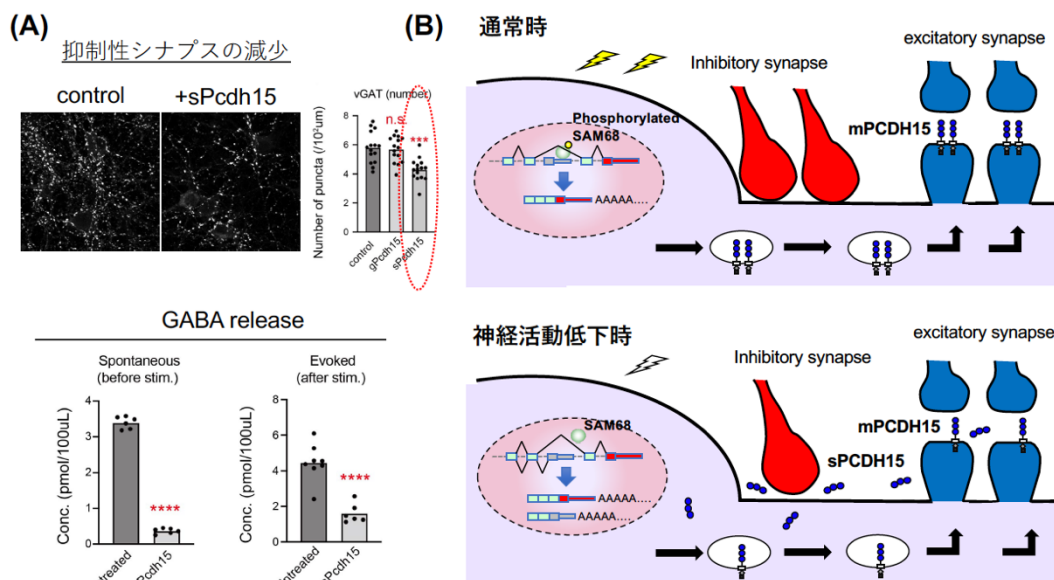
さらに驚くべきことに、sPCDH15 を神経細胞に発現させた場合、興奮性に加えて抑制性シナプスの数も有意に減少した。これは機能喪失型の *Pcdh15 ex6 KO* の神経細胞では見られなかったことから sPCDH15 の機能獲得型効果であることがわかった。sPCDH15 は興奮性よりむしろ抑制性シナプス数と機能変化をより強く調べると、sPCDH15 の一部が抑制性シナプス部位に集積している様子が免疫染色で明らかになり、細胞内局在の異所的な変化が起こっていることがわかった。さらに、培養神経細胞と抑制性シナプスオーガナイザーである Neuroligin-2 を遺伝子導入し発現させた HEK293T 細胞の共培養系における人工シナプス形成アッセイにおいて、sPCDH15 は Neuroligin-2 を発現した HEK293T 細胞表面に誘



(図 4) 接着因子プロトカドヘリン15のALEスプライシングエラーによるタンパク質の細胞内局在変化 (Darwish et al., *BioRxiv.*, 2023)

導される VGAT 陽性の抑制性シナプス形成を有意に抑制した。それに対して興奮性シナプスの誘導に関しては抑制しなかったことから、人工シナプス形成アッセイにおいても sPCDH15 の抑制性シナプス機能に対する強い選択的阻害効果が示された。

SAM68 による *Pcdh15* の ALE 変化の生理的意義としては、TTX による神経活動の遮断によって sPCDH15 が生成された点から考えていくと、脳適応的变化として起こるシナプス活動の最適化(ホメオスタティックな可塑的变化)に寄与するのではないかと予想する(図 5B)。mRNA の 3 末端側(タンパク質では C 末端側)が環境に応じて柔軟に変化することで脳機能を適応的に調節すると予想される。しかしながら、脳の適応的な回路再編についてはまだ多くのことが知られておらず、このような分子基盤の解明が適応脳の理解に大きな貢献をもたらすかもしれない。



(図 5) 神経系におけるプロトカドヘリン15のALEスプライシング変化による抑制性シナプスの異常 (A) と適応的なシナプス調節のモデル (B) (Darwish et al., *BioRxiv.*, 2023)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sato Yuji, Iijima Yoko, Darwish Mohamed, Sato Tadayuki, Iijima Takatoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Distinct Expression of SLM2 Underlies Splicing-Dependent Trans-Synaptic Signaling of Neurexin Across GABAergic Neuron Subtypes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11064-021-03384-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ozaki Yuta, Ohashi Koji, Otaka Naoya, Ogawa Hayato, Kawanishi Hiroshi, Takikawa Tomonobu, Fang Lixin, Tatsumi Minako, Takefuji Mikito, Enomoto Takashi, Darwish Mohamed, Iijima Yoko, Iijima Takatoshi, Murohara Toyoaki, Ouchi Noriyuki	4. 巻 593
2. 論文標題 Neuron-derived neurotrophic factor protects against dexamethasone-induced skeletal muscle atrophy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 5~12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.01.028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Darwish Mohamed, Ito Masatoshi, Takase Akinori, Ayukawa Noriko, Suzuki Satoko, Tanaka Masami, Iijima Yoko, Iijima Takatoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 SAM68-regulated ALE selection of Pcdh15 maintains proper synapse development and function	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2023.04.04.535307	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ito Masatoshi, Fujii Natsuko, Kohara Saori, Hori Shuho, Tanaka Masayuki, Wittwer Christopher, Kikuchi Kenta, Iijima Takatoshi, Kakimoto Yu, Hirabayashi Kenichi, Kurotaki Daisuke, Jessen Henning J., Saiardi Adolfo, Nagata Eiichiro	4. 巻 299
2. 論文標題 Inositol pyrophosphate profiling reveals regulatory roles of IP6K2-dependent enhanced IP7 metabolism in the enteric nervous system	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102928 ~ 102928
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2023.102928	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 飯島崇利
2. 発表標題 神経活動をトリガーする軸索起始部の構造とダイナミクスの理解
3. 学会等名 2021年度日本神経化学会大会（オンライン）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takatoshi Iijima
2. 発表標題 Neuronal Alternative Pre-mRNA Splicing: A Key Mechanism for Synaptic and Axonal Plasticity
3. 学会等名 Young investigator 's Research Seminar at University of Tsukuba（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田中 正視 (Taknaka Masami) (50706182)	東海大学・医学部・客員講師 (32644)	
研究分担者	甲斐田 大輔 (Kaida Daisuke) (60415122)	富山大学・学術研究部医学系・准教授 (13201)	
研究分担者	三上 克央 (Mikami Katsunaka) (90548504)	東海大学・医学部・准教授 (32644)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	飯島 陽子 (Iijima Yoko) (50451860)	東海大学・医学部・特定研究員 (32644)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
エジプト	Dept. of pharmaceutical Science	University of Cairo		
スイス	Biozentrum	University of Basel		